第34卷 第2期 昆 虫 学 报 Vol. 34, No. 2
1991年5月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1991

蓖麻蚕两种凝集素在蚕体内的出现与分布*

彭金荣 孙册
(中国科学院上海生物化学研究所，上海 200031)

摘要 蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 血淋巴含两种凝集素，一种凝集兔新鲜红血球，凝血活力被 L-鼠李糖和 D-半乳糖抑制；另一种凝集戊二醛固定的人和鸡的红血球，凝血活力被聚岩藻糖抑制。它们在蚕的不同生长阶段及在蚕体各组织中的分布和凝血活力显著不同。血淋巴中这两种凝集素的凝血活力明显比其他组织中高。卵中测不到这两种凝集素活力。本文对这两种凝集素在蚕体中可能的生理功能进行了讨论。

关键词 蓖麻蚕 凝集素

对于昆虫凝集素的研究，目前尚处于初期阶段，已有资料比较零散。Komano 等(1980、1981)发现了雪隐肉蝇 *Sarcophaga peregrina* 凝集素，并对其性质进行了研究。莫汉庆等(1983)发现蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 血淋巴中存在对半乳糖专一的凝集素，彭金荣等(1988)发现在蓖麻蚕血淋巴中除对鼠李糖、半乳糖专一的凝集素外，还存在另一种能凝集固定的人和鸡的红血球，其凝血活力被聚岩藻糖(含硫酸基的聚 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 岩藻糖)抑制的新凝集素。为进一步证实蓖麻蚕体内确实存在不同的凝集素，并探索它们在蚕体内可能的作用，我们观察了蓖麻蚕生长过程的各个阶段，这两种凝集素在不同组织中的分布和血凝活力的变化。

材料与方法

蓖麻蚕及蚕茧(黄白)由广东省农科院蚕种场提供。幼虫(二龄至吐丝)在 27℃ 恒温室饲养。

1. 血淋巴的收集 取四龄和五龄幼虫，剪开腹足；蛹剪破头部；血淋巴液从伤口滴出，收集于含少量苯基硫脲的试管中。二龄和三龄幼虫则先用乙醚麻醉，然后剪开背部，用微量移液管吸取血淋巴液。血淋巴液于 10000rpm 离心 2 分钟，取上清液测血凝活力。

2. 脂肪体、中肠和丝腺体抽提液的制备 从幼虫背部剪开，取出脂肪体、中肠和丝腺体(中肠和后部丝腺体先用 4℃ 蒸馏水漂洗)，用吸水纸将血淋巴液或水尽量吸净，在 PBS (0.075mol/L 磷酸缓冲液、0.075mol/L 氯化钠溶液), pH7.4 中按 1:3 (w/v) 匀浆，10000rpm 离心 6 分钟，取上清液测血凝活力。

3. 卵抽提液的制备 剪破蛹取出卵，经重蒸馏水漂洗，用吸水纸吸去水分，抽提方法同脂肪体。

4. 红血球的采集和处理

本文于 1988 年 12 月收到。
* 国家自然科学基金资助项目。

(1) 新鲜兔血球　耳静脉采血，以乙二胺四乙酸钠为抗凝剂，离心除去血浆，用 PBS (pH7.4) 洗涤数次，除尽血浆，然后用 PBS 配成 1% 的血球悬液。

(2) 固定的人和鸡血球　人全血系本组同志提供，鸡血为活鸡断头取血，均以乙二胺四乙酸钠为抗凝剂，固定方法两者相同。全血离心除去血浆，用 PBS(pH7.4) 洗净血浆，并用同一缓冲液配成 10% (*v/v*) 的血球悬液，加入含 4% 戊二醛的 PBS 立即混匀，室温搅拌过夜，然后用 PBS 离心洗涤，除去未作用的戊二醛，用 PBS 配成 10% 血球悬液，4℃保存。

5. 血凝活力的测定　在 V 型血球板上进行，样品倍比稀释，1 小时后肉眼观察结果，以使血球产生 50% 凝集的蛋白质量的倒数表示血凝活力。

6. 蛋白质含量测定　按 Bradford (1976) 法测定蛋白质含量，以牛血清白蛋白为标准。

结 果

一、蓖麻蚕生长发育过程中鼠李糖专一的凝集素(简称 PLL_1) 凝血活力的变化

1. 血淋巴液　蓖麻蚕不同生长期的幼虫、蛹及成虫血淋巴液凝集新鲜兔血球的活力变化：从幼虫二龄眠期(二龄眠期前很难采到血淋巴液)起可测到极微弱的 PLL_1 的血凝活力，以后随龄期增长逐渐上升，至五龄期达稳定状态(效价为 2^7，即淋巴液稀释至 2^7 显示 50% 的血凝活力)，蛹 PLL_1 的血凝效价没有明显变化(保持在 2^7-2^8)。血淋巴中的蛋白质含量则持续上升至上蔟。若以二龄眠期蚕血淋巴 PLL_1 的血凝比活(产生 50% 凝集血淋巴液蛋白质含量的倒数) 为一个单位，其他各期血凝比活的相对变化见表 1 和图 1。五龄后期的幼虫血淋巴液的血凝比活显著下降，是由于血淋巴液中蛋白质含量迅速上升导致的。以上结果表明，蓖麻蚕血淋巴液中 PLL_1 的变化与蛋白质合成的变化是不同步的。

2. 脂肪体　四龄起到羽化期间蓖麻蚕脂肪体中 PLL_1 的凝血活力测定表明：四龄期、五龄前期及中期幼虫的脂肪体中基本测不到凝血活力，只在五龄后期的幼虫、蛹及成虫的脂肪体中可测到微弱的 PLL_1 活力。

3. 中肠和丝腺体　四龄期、五龄前期和中期幼虫的中肠和丝腺体中均测不到 PLL_1 活力，五龄后期和吐丝期幼虫的丝腺体可测到极微弱的 PLL_1 活力。

二、蓖麻蚕生长发育过程中聚岩藻糖专一的凝集素(简称 PLL_2) 凝血活力的变化

1. 血淋巴液　幼虫期蓖麻蚕血淋巴液的 PLL_2 凝血活力的变化与 PLL_1 相似，亦是随龄期逐渐上升，二龄和三龄幼虫血淋巴液的血凝效价分别为 2^5 和 2^7，四龄开始血凝效价迅速上升，至五龄期达到 $2^{12}—2^{14}$，并稳定在该水平至上蔟。然而，蛹期 PLL_2 活力变化与 PLL_1 明显不同，PLL_2 血凝效价迅速下降，至羽化前几天蛹的血淋巴液中测不出 PLL_2 活力。羽化后(二天)成虫血淋巴中的 PLL_2 的血凝效价急剧上升，达到最高峰。同样，以二龄眠期血淋巴液的血凝比活为一个单位来计算其他各期血凝比活的单位 (表 1 和图 1)。成虫(羽化后二天)血淋巴液 PLL_2 的相对比活高达 32 个单位。以上结果说明 PLL_2 与 PLL_1 相似，不同生长期 PLL_2 活力的变化与蛋白质的变化亦是不同步的。然而，PLL_2 血凝活力的变化与 PLL_1 不一致。

表 1 蓖麻蚕血淋巴中 PLL_1 及 PLL_2 比活的消长情况

龄 期	PLL_1	PLL_2	蛋白质含量 (mg/ml)
二龄眠	1.00	1.00	1.50
三龄三十六小时	0.80	1.60	3.84
四龄起蚕	2.52	5.00	4.86
四龄一天	47.83	12.00	4.10
四龄二天	3.02	1.52	8.11
五龄起蚕	6.96	13.95	14.08
五龄一天	3.28	26.09	29.87
五龄二天	2.80	22.64	35.01
五龄三天	2.39	19.05	40.96
五龄四天	1.77	14.11	55.47
五龄五天	1.06	2.14	92.16
上簇	1.87	0.47	104.96
上簇二天	1.27	2.55	153.60
上簇五天(预蛹)	3.92	0.98	49.92
蛹一天	3.48	0.87	56.32
蛹三天	3.19	0.80	61.44
蛹五天	3.34	0.03	58.56
蛹七天	3.37	0.03	58.03
蛹九天	2.39	0.00	40.96
蛹十二天	1.85	0.00	53.04
蛾二天	1.59	32.00	61.44

注：PLL_1 和 PLL_2 活力测定分别用新鲜兔血球和固定鸡血球。比活以使血球 50% 凝集所需蛋白质量的倒数表示。以二龄眠的蚕血淋巴的凝血活力为 1，其余各期均以与二龄眠之比值表示。

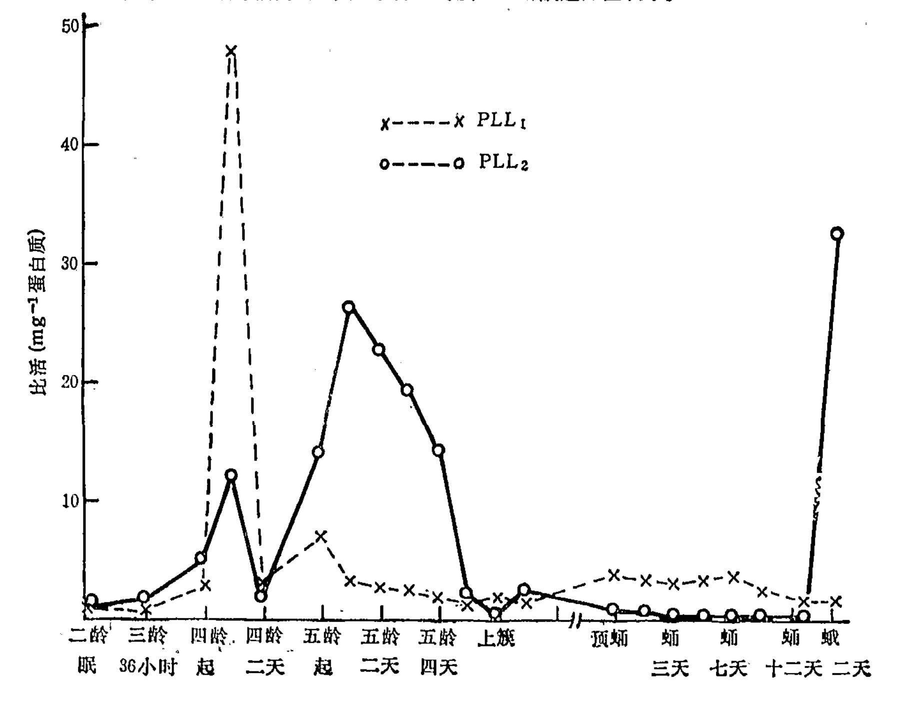


图 1 蓖麻蚕各生长阶段血淋巴中 PLL_1 和 PLL_2 血凝比活的变化(说明见表 1)

表 2 蓖麻蚕各组织中 PLL_2 的消长

龄 期	血淋巴	脂肪体	中 肠	丝腺体
二龄眠	1.00			
三龄三十六小时	1.60			
四龄起蚕	5.00			
四龄一天	12.00			
四龄二天	1.52			
五龄起蚕	13.95		0.025	0.000
五龄一天	26.09	0.016	0.013	0.010
五龄二天	22.64	0.027	0.009	0.008
五龄三天	19.05	0.011	0.011	0.012
五龄四天	14.11	0.062		0.012
五龄五天	2.14	0.112	0.007	0.000
上簇	0.47	0.144	0.028	0.000
上簇二天	2.55	0.050	0.013	0.000
上簇五天(预蛹)	0.98	0.192		
蛹一天	0.87	0.086		
蛹三天	0.80	0.053		
蛹五天	0.03	0.009		
蛹七天	0.03	0.007		
蛹九天	0.00	0.000		
蛹十二天	0.00	0.000		
蛾二天	32.00	0.015		

脂肪体、中肠、丝腺体的比活以二龄眠蚕血淋巴比活为 1 的比值表示。

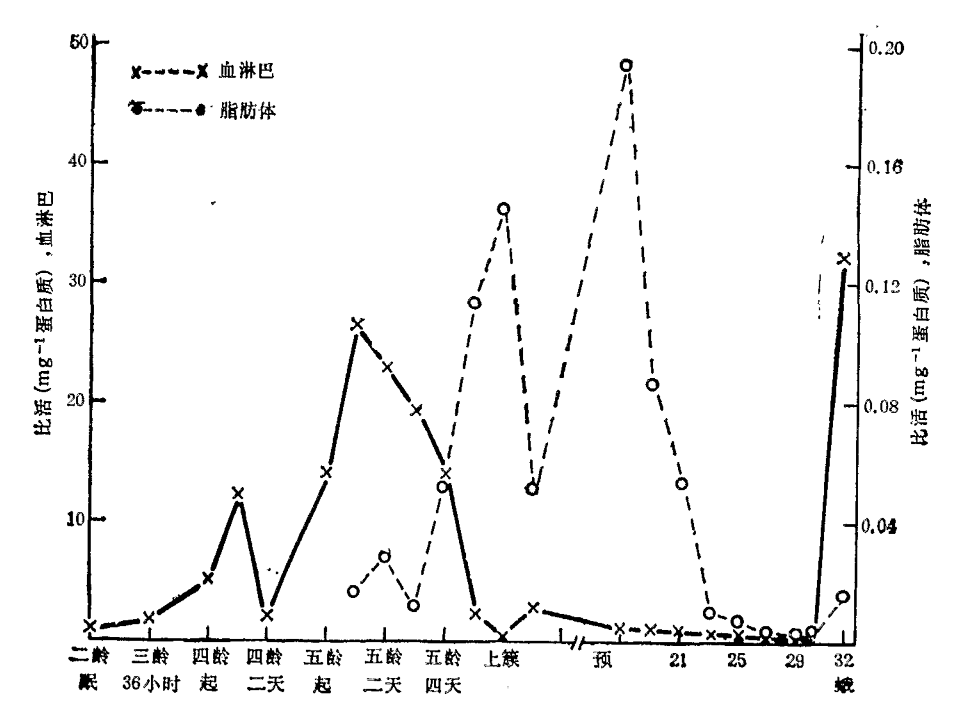


图 2 蓖麻蚕各生长阶段血淋巴和脂肪体中 PLL_2 活力变化的比较(说明见表 2)

2. 脂肪体　测定五龄一天整到羽化期间蚕脂肪体 PLL_2 的凝血活力表明：随着幼虫龄期的增长，脂肪体中 PLL_2 的血凝效价亦上升，五龄一天为 2^2，到五龄六天升到 2^6。蛹期 PLL_2 的血凝效价则逐渐下降，至羽化前几天测不出 PLL_2 活力。羽化后第二天可测到较低的 PLL_2 活力(表 2 和图 2)。比较脂肪体和血淋巴液中 PLL_2 活力，则脂肪体显著低于血淋巴液。

3. 丝腺体　五龄前期和中期幼虫的后部丝腺体中可测到微弱的 PLL_2 活力，五龄五天 PLL_2 活力消失(表 2)。

4. 中肠　五龄各天至上簇二天，蓖麻蚕中肠 PLL_2 血凝效价基本不变，保持低水平，血凝比活变化见表 2。

PLL_1 和 PLL_2 的凝血活力在卵中均未测到。

讨　　论

在蓖麻蚕生长发育过程中，两种凝集素在体内各组织中的分布不同。五龄前期和中期的幼虫脂肪体中测不到 PLL_1 活力；但五龄一天幼虫的脂肪体显示 PLL_2 活力；丝腺体和中肠中基本测不到 PLL_1 活力，但有微弱的 PLL_2 活力。血淋巴液中两种凝集素的凝血活力的变化亦有明显差异，如 PLL_1 的比活最高峰为四龄一天，47.83 个单位；而 PLL_2 的比活最高峰为羽化二天的成虫，为 32 个单位；蛹期 PLL_1 活力保持平稳，而 PLL_2 活力逐渐下降至消失。以上结果均说明 PLL_1 与 PLL_2 是两种不同的凝集素。

五龄期幼虫血淋巴液中蛋白质含量迅速上升，可能是幼虫为化蛹作准备加速蛋白质合成的结果，这类蛋白质是生物体中的储存蛋白质。而五龄期幼虫血淋巴液中的 PLL_1 和 PLL_2 的血凝比活均有所下降，提示凝集素的合成没有因储存蛋白质合成加快而增加，是与储存蛋白质不同的一类蛋白质。 Komano 等(1981)根据对雪隐肉蝇血淋巴凝集素研究的结果，提出昆虫凝集素在生物体内可能起免疫监视作用，有待进一步探讨。

Komano 等(1980)用针刺法诱导雪隐肉蝇产生凝集素，屈贤铭等(1985)用大肠杆菌或 PolyI:C 诱导家蚕和柞蚕的蛹，发现经诱导蛹的提取液凝集新鲜兔血球的活力明显升高。我们用 PolyI:C 分别诱导五龄前期和后期蓖麻蚕幼虫和蛹，48 小时后测凝血活力，没有上升，提示 PolyI:C 对 PLL_2 没有诱导作用，可能 PLL_2 不参与免疫系统。蓖麻蚕变态时 PLL_2 凝血活力的变化最大，提示 PLL_2 可能与变态有关。

参　考　文　献

屈贤铭、李士云　1985　大肠杆菌及聚肌胞核苷酸对柞蚕、家蚕蛹诱导产生溶菌酶、抗菌肽及凝集素的动力学。昆虫学报　28(1): 1—7。

莫汉庆、孙册　1983　蓖麻蚕血淋巴中的凝集素。生物化学与生物物理学报　15(4): 383—4。

彭金荣、孙册　1988　蓖麻蚕血淋巴中的一种新凝集素。生物物理与生物化学　20(3): 329—31。

Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(12): 248—54.

Komano, H. et al 1980 Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. *J. Biol. Chem.* 255(7): 2919—24.

Komano, H. et al 1981 A possible mechanism of induction of insect lectin. *J. Biol. Chem.* 256(14): 7087—9.

THE OCCURRENCE AND DISTRIBUTION OF TWO LECTINS IN *PHILOSAMIA CYNTHIA RICINI*

PENG JING-RONG SUN CE

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai* 200031)

Two lectins have been found in the hemolymph of the *Philosamia cynthia ricini* larvae: one agglutinates fresh rabbit erythrocytes and the other agglutinates glutaraldehyde-fixed chiken erythrocytes. The haemaglutinating activity of the former is specifically inhibited by L-rhamnose and D-galatose and that of the latter inhibited by fucoidin. Their activities changed significantly in different developmental stages of this species as shown in fig. 1 and 2. But they cannot be detected in the eggs. The haemolymph displayed higher lectin activity than any other tissues. The possible functions of these two lectins in this species are discussed.

Key words *Philosamia cynthis ricini*——lectin